

# The application of micro-fish in clinical cytogenetics

Citation for published version (APA):

Engelen, J. J. M. (1998). *The application of micro-fish in clinical cytogenetics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19980320je>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1998

**DOI:**

[10.26481/dis.19980320je](https://doi.org/10.26481/dis.19980320je)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

---

Human cytogenetics is the discipline that is directed towards the study of human chromosomes at the microscopic level. During cell division the DNA present in the nucleus of the cell is packaged in chromosomes which can be individually identified. After treatment with trypsin and staining with Giemsa the chromosomes display a so called GTG-banding pattern. This technique allows to distinguish 350-550 bands in a haploid set of chromosomes. The banding pattern is characteristic for each pair of chromosomes and thus allows the detection of aberrant chromosomes. Chromosome aberrations may be numerical (a number other than 46) or structural. In the group of structural aberrations that can be diagnosed, chromosomal material may be lost (deletion) or may be present twice (duplication). Furthermore, a part of a chromosome can be inverted within that chromosome (inversion) and chromosome parts can be exchanged between two or more chromosomes (translocation).

In the past 15 years fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has become increasingly important in human cytogenetics. This technique can provide information about the presence and expression of specific DNA sequences in dividing and non-dividing cells. For FISH, a probe (a short DNA sequence) is labeled with a reporter molecule. This probe is hybridized with cellular DNA and binds with the complementary sequence within that DNA (hybridization). The hybridization site is visualized with a fluorescent molecule coupled with an antibody directed against the reporter molecule.

Despite GTG-banding and FISH there still exist chromosome aberrations that cannot be characterized completely. Micro-FISH is a technique that solves this problem. Microdissection combined with FISH (micro-FISH) comprises 4 different steps: (1) dissection of a (part of a) chromosome with microneedles, (2) amplification of the chromosomal material using the polymerase chain reaction (PCR), (3) labeling of the PCR product with a reporter molecule, and last (4) hybridization of the DNA on a normal metaphase and immunological detection. This procedure results in a fluorescent spot on the homologous chromosomes in the metaphase from which the dissected material originates.

In chapter 1, the development and the current status of micro-FISH, and its applications in molecular genetics and clinical cytogenetics are discussed. In chapter 2, a simple and efficient method for microdissection and DNA amplification is described. In chapter 3, micro-FISH was used to disclose the chromosomal origin of three marker chromosomes and the results were confirmed with chromosome painting. Chapter 4 reports on the application of micro-FISH to characterize a complex chromosome translocation. FISH with chromosome specific paints showed that at least four breakpoints were involved in this chromosome rearrangement, with micro-FISH a fifth breakpoint was detected which was characterized further with band-specific probes. Chapter 5 describes the application of micro-FISH for the detection of chromosomal deletions and the delineation of deletions in aberrant chromosomes. In chapter 6 the study of deletion detection was extended, a deleted region was characterized further with band-specific probes and the patient's phenotype is compared with other patients reported in the literature. Chapter 7 describes the application of a band-specific paint, generated by microdissection and subsequent DOP-PCR amplification, for the charac-

terization of a intrachromosomal duplication. Furthermore the clinical picture of the patient was compared with other patients reported in the literature with a duplication of chromosome region 15q11-q13. Chapter 8 contains a general discussion with conclusions and future perspectives.

In clinical cytogenetics, micro-FISH is a suitable technique to characterize chromosome aberrations (marker chromosomes, unbalanced translocation, duplications), especially when GTG-banding alone offers no solution. Also, loss of chromosomal material can be visualized and breakpoints can be determined more precisely. As only a few copies of chromosome (part)s under study have to be available for microdissection, micro-FISH is also suitable when only few mitotic divisions are available as is frequently the case in tumor material.

## SAMENVATTING

---

De humane cytogenetica houdt zich bezig met het onderzoek van chromosomen van de mens op microscopisch niveau. Tijdens de celdeling of mitose, is het DNA aanwezig in de vorm van individueel te onderscheiden chromosomen. Na behandeling met het enzym trypsine en kleuring met de kleurstof Giemsa vertonen chromosomen een z.g. GTG-banderingspatroon. Per haploide set chromosomen kunnen zo 350-550 banden van elkaar onderscheiden worden. Dit banderingspatroon is karakteristiek voor elk chromosoompaar en stelt ons in staat afwijkende chromosomen op te sporen.

Chromosomale afwijkingen kunnen numeriek zijn (dus meer of minder dan het normale aantal van 46) of structureel. Bij de structurele afwijkingen kan er sprake zijn van verlies van een deel van het chromosoom (deletie) of van verdubbeling van een chromosoomdeel (duplicatie). Verder kan een deel van het chromosoom omgekeerd binnen een chromosoom aanwezig zijn (inversie). Ook kunnen delen van chromosomen onderling uitgewisseld zijn (translocatie).

Gedurende de afgelopen 15 jaar is fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) een steeds belangrijkere rol gaan spelen in het chromosomen onderzoek van de mens. Deze techniek kan informatie verschaffen over het aanwezig zijn en de expressie van specifieke DNA sequenties in delende en niet-delende cellen. Bij FISH wordt een probe (een klein DNA deeltje) gemerkt met een reporter molecuul. Deze probe wordt gebracht op cellulair DNA waarbij de probe bindt aan de complementaire sequentie in dat DNA (hybridisatie). Vervolgens wordt een antilichaam (met daaraan gekoppeld een fluorescerende stof) gericht tegen het reporter molecuul gebruikt om de plaats van de probe op het DNA zichtbaar te maken. Met behulp van een fluorescentie microscoop is de lokalisatie van de probe op het cellulair DNA te zien als een fluorescerend signaal.

Ondanks de beschikbaarheid van deze technieken zijn er echter nog steeds chromosomale afwijkingen die niet (volledig) gekarakteriseerd kunnen worden. Hiervoor is de afgelopen jaren micro-FISH ontwikkeld. Microdissectie gecombineerd met fluorescente *in situ* hybridisatie (micro-FISH) is een techniek waarbij een viertal verschillende stappen zijn te onderscheiden: (1) dissectie van een (deel van een) chromosoom m.b.v. een zeer dunne glazen naald, (2) vermeerdering van het gedissesecteerde chromosomale materiaal met behulp van de polymerase ketting reactie, (3) inbouwen van een reporter molecuul in dat chromosomaal DNA, en tenslotte (4) hybridisatie van het gesynthetiseerde DNA op een normale metafase en detectie. Het resultaat van deze procedure is dat er in de metafase een fluorescentie signaal zichtbaar is op het chromosoom waarvan het gedissesecteerde materiaal afkomstig is. Als er dus een stukje chromosoom van onbekende herkomst wordt gedissesecteerd kan men na micro-FISH aan de hand van het fluorescentie signaal op een of meer chromosomen in een metafase bepalen van welk chromosoom dit materiaal oorspronkelijk afkomstig was. In hoofdstuk 1 van dit proefschrift is de ontwikkeling van micro-FISH beschreven, alsmede de stand van zaken op dit moment. Verder wordt gerapporteerd over de toepassing van micro-FISH in moleculair genetisch en klinisch cytogenetisch onderzoek. In hoofdstuk 2 wordt een eenvoudige maar efficiënte methode beschreven voor microdissectie en DNA amplificatie. In hoofdstuk 3 wordt micro-FISH gebruikt om de

herkomst van een drietal marker chromosomen te bepalen, waarbij de onderzoeksresultaten zijn bevestigd met chromosoom-specifieke paints. In hoofdstuk 4 is de karakterisering van een complexe chromosoom translocatie beschreven. FISH met chromosoom-specifieke paints toonde aan dat bij deze chromosomale afwijking ten minste 4 breukpunten aanwezig waren; met micro-FISH werd een 5de breukpunt aangetoond dat vervolgens met band-specifieke probes verder werd geanalyseerd. Hoofdstuk 5 beschrijft hoe met micro-FISH de positie van een deletie in een chromosoom en dus ook de breukpunten kunnen worden bepaald. Voorts werd aangetoond dat ook microdeleties zichtbaar kunnen worden gemaakt als de gegenereerde probe wordt gehybridiseerd op high-resolution chromosomen. In hoofdstuk 6 is een deletie die met micro-FISH werd aangetoond, met band specifieke probes nader in kaart gebracht. Dit gaf vervolgens de mogelijkheid de klinische kenmerken van het patiëntje in kwestie te vergelijken met in de literatuur beschreven patiënten. Een intrachromosomale duplicatie wordt in hoofdstuk 7 gekarakteriseerd, waarna een beschrijving volgt van andere patiënten uit de literatuur met een dergelijke duplicatie. Hoofdstuk 8 bevat een algemeen overzicht met conclusies en ontwikkelingen in de nabije toekomst. In de klinische cytogenetica is micro-FISH een geschikte techniek om chromosomale afwijkingen (marker chromosomen, ongebalanceerde translocaties, duplicaties) te karakteriseren, vooral als de klassieke GTG-banding te kort schiet. Ook kan met deze techniek verlies van chromosomaal materiaal worden aangetoond en kunnen breukpunten nader worden bepaald. Het feit dat slechts een klein aantal afwijkende chromosomen beschikbaar hoeft te zijn voor microdissectie, maakt dat deze techniek ook bruikbaar is als er maar geringe hoeveelheden cellen beschikbaar zijn, hetgeen regelmatig het geval is bij materiaal afkomstig van tumoren.